

**PCT**WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/13, C07K 13/00 C12P 21/08, A61K 39/42 G01N 33/569	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 91/18983 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 12. Dezember 1991 (12.12.91)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/AT91/00067 (22) Internationales Anmeldedatum: 28. Mai 1991 (28.05.91) (30) Prioritätsdaten: A 1178/90 29. Mai 1990 (29.05.90) AT (71)(72) Anmelder und Erfinder: JUNGBAUER, Alois [AT/AT]; Skrapupstr. 24/36/19, A-1210 Wien (AT). KATINGER, Hermann [AT/AT]; Heiligenstädterstr. 131/5/16, A-1190 Wien (AT). RÜKER, Florian [AT/AT]; Alszeile 42/8, A-1170 Wien (AT). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US) : FELGENHAUER, Martin [AT/AT]; Hasnerstraße 91/2/29, A-1160 Wien (AT). HIMMLER, Gottfried [AT/AT]; Colloredogasse 29/13, A-1180 Wien (AT). KOHL, Johann [AT/AT]; Liniengasse 22/8, A-1060 Wien (AT). STEINDL, Franz [AT/AT]; Koppstr. 69/23, A-1160 Wien (AT).		(74) Anwälte: ITZE, Peter usw. ; Amerlingstraße 8, A-1061 Wien (AT). (81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FI, FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), HU, IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), NO, SE (europäisches Patent), SU, US. Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>
(54) Title: RECOMBINANT PROTEIN WHICH BINDS TO A COMPLEX VIRAL ANTIGEN OF HIV-1 (54) Bezeichnung: KOMPLEXES VIRALES ANTIGEN VON HIV-1 BINDENDES REKOMBINANTES PROTEIN (57) Abstract The invention relates to a recombinant protein which binds to a complex viral antigen of HIV-1. The manufacture, production, purification and application of this protein are described. The protein contains the variable regions of a human anti-HIV-1 antibody connected by a linker. The production is carried out in various prokaryotic or eukaryotic systems. Biochemical chromatographic methods are used for the purification. The described recombinant protein can be used for detecting, quantifying and purifying HIV-1 antigen. (57) Zusammenfassung Die Erfindung bezieht sich auf ein an ein komplexes virales Antigen von HIV-1 bindendes rekombinantes Protein. Es wird die Herstellung, Produktion, Reinigung und Anwendung dieses Proteins beschrieben. Das Protein enthält die variablen Regionen eines humanen anti-HIV-1 Antikörpers verbunden über einen Linker. Die Produktion erfolgt in verschiedenen prokaryontischen bzw. eukaryontischen Systemen. Zur Reinigung werden biochemische chromatographische Methoden eingesetzt. Das beschriebene rekombinante Protein kann zur Detektion, zur Quantifizierung und zur Reinigung von HIV-1 Antigen eingesetzt werden.		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	ES	Spanien	ML	Mali
AU	Australien	FI	Finnland	MN	Mongolei
BB	Barbados	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BE	Belgien	GA	Gabon	MW	Malawi
BF	Burkina Faso	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BG	Bulgarien	GN	Guinea	NO	Norwegen
BJ	Benin	GR	Griechenland	PL	Polen
BR	Brasilien	HU	Ungarn	RO	Rumänien
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TG	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		

Komplexes virales Antigen von HIV-1 bindendes rekombinantes Protein

Humane monoklonale Antikörper (mAk) lassen sich herstellen, indem man B-5 Lymphozyten von Menschen, welche gegen ein Antigen beispielsweise durch Krankheit eine Immunreaktion zeigen, gewinnt, und diese B-Lymphozyten durch Fusion mit geeigneten Zelllinien, im besonderen mit Myelomzelllinien, immortalisiert. Solcherart gewonnene Hybrid-Zelllinien, Hybridomas, dienen als Produktionsvehikel für mAk's. Sie können in vitro in Form von Zellkulturen eingesetzt werden und in dem erforderlichen Maß-10 stab kultiviert werden (1).

Die dabei produzierte Substanz stellt im Regelfall einen kompletten mAk dar, charakterisiert durch 2 schwere Ketten und 2 leichte Ketten, welche untereinander durch Disulfidbrücken und durch nicht-kovalente Bindungen verbunden sind, und in ihrer Ge-15 meinschaft den spezifisch bindenden Antikörper bilden (2).

Die Struktur eines solchen Antikörpers läßt sich unterteilen in eine konstante Region, welche für die sogenannten Effektorfunktionen, wie z.B. Komplementaktivierung, verantwortlich ist und in eine variable Region, welche die spezifische Bindung des jewei-20 ligen Antigens hervorruft.

Antikörper können durch biochemische Methoden enzymatisch gespalten werden. Beispielsweise kann durch Papain bzw. durch Pepsin ein Teil der konstanten Region abgespalten werden. Die auf diese Weise hergestellten Fab' bzw. (Fab')₂ Fragmente sind 25 in einer dem ursprünglichen Antikörper analogen Weise in der Lage, das betreffende Antigen zu binden (2). Auch die proteolytische Abspaltung der kompletten konstanten Regionen, welche zu einem sogenannten Fv Fragment führt, wurde beschrieben. Sie ist jedoch bei weitem nicht so reproduzierbar durchführbar wie die weiter oben erwähnte Papain- bzw. Pepsin-Spaltung von Antikörpern (3, 4). Mit Methoden der Gentechnik 30 gelingt es jedoch, Fv Fragmente auf reproduzierbare Weise herzustellen. Die dazu not-

wendigen Voraussetzungen sowie die angewandten Methoden werden in der Folge beschrieben.

Mit Hilfe von Routinemethoden wird eine cDNA Bank von einer mAk-
5 produzierenden Hybridomzelllinie hergestellt. Aus mAk-produzierenden Hybridomas wird gesamt-RNA isoliert. Diese RNA enthält neben ribosomaler RNA die Gesamtheit der Transkripte der Zelle. Es liegen sowohl unvollständig prozessierte, nukleäre Transkripte, als auch die reifen, cytoplasmatischen Transkripte, die sogenannten messenger RNA's, vor. Diese zeichnen sich durch einen poly-Adenosin-Schwanz am 3'-Ende aus.
10 Diese poly-A Region kann verwendet werden, um durch Affinitätschromatographie mit oligo-dT Zellulose die reifen mRNAs zu isolieren. Mit Hilfe des Enzyms "reverse Transkriptase" kann die mRNA zu einer sogenannten cDNA umgeschrieben werden. Durch Verwendung geeigneter Vektoren kann das erhaltene Gemisch von cDNAs kloniert werden, was zu einer sogenannten cDNA Bank führt (5). Immunglobulin-spezifische Hybri-
15 disierungssonden erlauben die Identifikation und Isolierung von Klonen welche die gewünschten Sequenzen enthalten). Durch Sequenzieren der DNA dieser Klone und Sequenzvergleich mit bekannten Immunglobulinen (EMBL Nucleotide Sequence Data Library, Heidelberg, BRD) kann Sicherheit über die Identität der Klone gewonnen werden (5). Auf diese Weise können beispielsweise Klone isoliert werden, die die Sequenzen
20 der leichten bzw. der schweren Kette eines mAK tragen.

Durch Sequenzanalyse der solcherart erhaltenen Immunglobulin-cDNAs lassen sich durch Vergleich mit bekannten Immunglobulinsequenzen die einzelnen Domänen der schweren bzw. der leichten Kette identifizieren: es ist möglich, die variable und die
25 konstante Region zu identifizieren, und z.B. innerhalb der variablen Region die sogenannten "hypervariablen" oder "complementarity determining regions", welche eigentlich für die spezifische Antigenbindung verantwortlich sind (6).

Solcherart klonierte Antikörpergene lassen sich in verschiedenen Systemen zur
30 Expression bringen. Einerseits können tierische Zellkulturen verwendet werden, wie z.B.

Myelomzellen, wenn man geeignete Expressionsvektoren verwendet (7). Die Verwendung von Hefe (8) bzw. von Bakterienzellen (9) als Expressionsvehikel für komplette Antikörper ist problematisch, da solche Zellen offenbar nicht in der Lage sind, die für sie sehr großen Moleküle, wie Antikörper sie darstellen, korrekt zu synthetisieren. Erfolg in dieser Richtung zeichnete sich erst ab, als versucht wurde, Subfragmente von Antikörpern in niederen Eukaryonten bzw. in Prokaryonten zur Expression zu bringen. Im Folgenden werden vier verschiedene Methoden beschrieben, welche die Expression von Fv bzw. Fab Fragmenten in *Escherichia coli* erlauben:

10 Skerra und Plückthun (1988, (10)) insertierten die Gene für die variablen Regionen eines murinen anti-Phosphorylcholin - Antikörpers (McPC603) im Anschluß an die Lac-Promoter/Operator Region, gefolgt von je einer bakteriellen Leader-Sequenz, welche zur Ausschleusung der Produkte in den periplasmatischen Raum der Bakterien dient. Es handelt sich dabei um den Leader des outer membrane protein A (ompA) sowie der alkalischen Phosphatase (phoA). Nach Transfektion dieses Plasmids in *Escherichia coli* wurde die Expression von funktionellem, d.h. Antigen-bindendem Protein im periplasmatischen Raum der Bakterien nachgewiesen.

Better et al. (1988, (11)) produzierten das Fab-Fragment eines chimären murin/humanen Antikörpers, welcher ein Gangliosid-Antigen, wie es häufig an der Oberfläche humaner Karzinomzellen gefunden wird, erkennt. Die hierbei angewandte Plasmidkonstruktion besteht aus dem *Salmonella typhimurium* araB Promoter, sowie der pelB leader Sequenz jeweils vor der für die jeweilige Kette kodierenden Sequenz. Es wurden Antigen-bindende Fab Fragmente aus dem Kulturüberstand der transformierten Bakterien 25 gewonnen.

Interessanterweise benützten sowohl Skerra und Plückthun (1988, (10)) und Better et al. (1988, (11)) sogenannte dicistronische Konstruktionen, d.h. solche, bei denen auf einem einzigen messenger-RNA Molekül die Information für die beiden getrennt zu 30 exprimierenden Ketten vorliegt. Die Autoren geben an, daß dadurch die räumliche Nähe

der entstehenden Polypeptidketten gewährleistet ist, welche eine Voraussetzung für die korrekte Zusammenlagerung der variablen Region der schweren (V_H) mit der der leichten Kette (V_L) Kette bildet.

- 5 Genau dieses Problem, nämlich die Ausbildung des Fv-Peptid-Heterodimers (in der Natur nicht kovalent verbunden) wurde von Huston et al. (1988, (12)) und von Bird et al. (1988, (13)) auf andere Weise zu lösen versucht, nämlich durch kovalente Verknüpfung der Ketten über eine Aminosäure-Linkersequenz, wie sie in der Natur nicht vor-
- 10 Zahl und Sequenz von Aminosäuren besteht, sodaß sie die Distanz, welche in der natürlichen Konformation eines Antikörpers zwischen den zu verbindenden Regionen besteht, überbrücken kann, ohne unnötigen Streß in die Konformation einzuführen:

Huston et al. (1988, (12)) verknüpften die variablen Regionen eines murinen anti-
15 Digoxin Antikörpers über einen Linker von 15 Aminosäuren der Sequenz GGGGSGGGGSGGGGS. Die gewählte Anordnung war: V_H - Linker - V_L . Dieses sogenannte single-chain Fv Fragment wurde in Verbindung mit der MLE Leader Sequenz unter der Kontrolle des synthetischen trp-Promoter/Operators in Form unlöslicher Inclusion bodies exprimiert. Nach deren Auflösung in 6M Guanidin-HCl und Entfernung des
20 Leaders durch saure Hydrolyse zwischen den Aminosäuren Asp und Pro, sowie nach einigen Chromatographieschritten wurde aktives, Antigen-bindendes single-chain Fv Fragment gewonnen.

Eine im Prinzip analoge Vorgangsweise wurde von Bird et al. (1988, (13)) für die
25 Konstruktion eines murinen Antigen-bindenden Proteins, welches spezifisch Fluoreszein bindet, gewählt. Diese Gruppe verwendete jedoch einen Linker von 18 Aminosäuren mit der Sequenz KESGSVSSEQLAQFRSLD. Dieser Linker ist ein Teil der Sequenz der humanen "carbonic Anhydrase", und wurde aus der Brookhaven Proteinstruktur-Datenbank als Loopstruktur ausgewählt, welche räumlich genau auf die Position der
30 miteinander zu verbindenden Aminosäuren des Fv Fragments passt. Die Anordnung der

einzelnen Regionen war hier anders als bei Huston et al. (1988, (12)), nämlich V_L - Linker - V_H .

Die oben beschriebenen Genkonstruktionen zur Produktion von Antikörperfragmenten in *Escherichia coli* beziehen sich auf murine Sequenzen bzw. in einem Fall auf ein murin/human Chimäres. Es wurden noch keine entsprechenden Versuche mit humanen Sequenzen publiziert.

Fab', (Fab')₂ und Fv Fragmente bieten verschiedene Vorteile gegenüber kompletten Antikörpern. Auf Grund ihrer Kleinheit im Vergleich zu kompletten Antikörpern können sie leichter und schneller diffundieren, sowohl in vitro als auch bei eventuellen in vivo Applikationen. Aus demselben Grund sind sie generell leichter handhabbar, und sind in den meisten Fällen, bei denen die Funktionen der konstanten Regionen (z.B. Effektorfunktionen, Bindung an Zellrezeptoren, Bindung an andere Moleküle) nicht benötigt werden bzw. sogar Nachteile bringen, kompletten Antikörpern gleichwertig und gegebenenfalls sogar vorzuziehen. Beispielsweise entstehen beim Tumor-Imaging bei der Verwendung kompletter Antikörper häufig Probleme durch Hintergrundsignale, welche durch unspezifische Bindung der Antikörper an Zellrezeptoren, vermittelt durch die konstanten Regionen der Antikörper, bedingt sind. Es ist bekannt, daß bei Verwendung von Fab-Fragmenten solche Probleme reduziert werden können. Es ist demnach zu erwarten, daß der Einsatz von Fv-Fragmenten bzw. von single-chain Fv-Fragmenten weitere Verbesserungen in dieser Beziehung bringen wird (13, 12).

Bis jetzt wurde mit Antikörpern murinen Ursprungs gearbeitet wurde, welche an kleine, gut beschriebene Antigene, wie Fluoreszein bzw. Digoxin binden. Die gesamte Genkonstruktion ist darauf aufgebaut, daß als Antigen eine niedermolekulare Substanz (MG kleiner 1000) gebunden wird. Die in der Natur bei weitem am häufigsten vorkommenden antigenen Substanzen sind Peptide, Peptidoglycane, Proteine und Polysaccharide, und als solche hochmolekular.

Erfindungsgemäß enthält das Protein der eingangs genannten Art die Antigenbindenden Regionen eines von der Zelllinie 3D6 (Accession Nr. 87110301, PHLS, Porton Down, UK (1, 14, 15, 16)) stammenden Antikörpers. Damit wird erstmals ein Protein humanen Ursprungs erhalten, welches die gewünschten Bindungseigenschaften aufweist und welches auch in einzelligen Mikroorganismen, wie Hefe oder Bakterien, exprimiert werden kann.

Weiters wird gemäß der vorliegenden Erfindung die Herstellung einer single-chain Konstruktion, die von einem humanen Antikörper abgeleitet ist, beschrieben. Diese single-chain Konstruktion bindet an ein hochmolekulares, komplexes, virales Antigen, im Gegensatz zu kleinen, gut definierten Antigenen.

Es war nicht vorauszusehen, daß die entsprechenden Methoden zur Konstruktion der single-chain Fragmente auch bei anderen als den publizierten Antikörpern, im besonderen bei humanen Antikörpern, zu funktionellen, d.h. Antigen-bindenden Molekülen führen würden.

Desgleichen liegt es nicht auf der Hand, daß komplexe Antigene wie z.B. Antigene an der Oberfläche von Viren, bei denen erfahrungsgemäß eine größere Zahl von Aminosäuren an der Antigen-Antikörperbindung beteiligt sind als bei kleinen Antigenen, in der gleichen Weise Manipulationen im Bereich der variablen Regionen der entsprechenden bindenden Antikörper tolerieren.

Ausgehend von der Zelllinie 3D6, welche einen humanen monoklonalen Antikörper des Typs IgG1/kappa produziert, welcher spezifisch mit HIV-1-gp41 reagiert, und eine schwache Kreuzreaktion mit HIV-1 gp120 zeigt (3D6; (1, 14, 15, 16)), wurde gesamt-RNA isoliert. Dabei wurde die Methode der Guanidin-Isothiocyanat Extraktion und Ultrazentrifugation über einen Polster von 5,7M CsCl angewandt (5).

Aus der gesamt-RNA wurde durch Adsorption an oligo-dT-Cellulose die poly A+ 30 - Fraktion, also die mRNA isoliert. (mRNA purification Kit, Fa. Pharmacia, Schweden).

Die mRNA diente als Substrat für die Synthese von cDNA (cDNA synthesis Kit, Fa. Pharmacia, Schweden).

- 5 Die Klonierung der cDNA Bank erfolgte im Plasmidvektor pUC19. Die rekombinanten Plasmide wurde in Escherichia coli, Stamm HB101, transformiert und auf LB Medium (5) kultiviert.

Positive Klone wurden durch Hybridisierung mit spezifischen Oligonucleotid-
10 Sonden identifiziert. Die Sequenzen für die Sonden wurden der EMBL DNA-Sequenz Datenbank aus konstanten Regionen von humanen IgG1-schweren bzw. Kappa-leichten Ketten entnommen.

Die durch positive Hybridisierungssignale identifizierten Klone wurden durch Re-
15 striktionsanalyse weiter charakterisiert, und diejenigen Klone, welche die Plasmide mit den längsten Inserts tragen, identifiziert.

Durch Sequenzanalyse dieser Klone wurde je ein Klon mit der kompletten kodierenden Region für die schwere bzw. für die leichte Kette des Antikörpers identifiziert.
20 Diese Klone tragen die Bezeichnung pUC3D6HC (SEQ ID NO: 1) bzw. pUC3D6LC (SEQ ID NO: 2).

Beispiel 1

- 25 In der Sequenz der Inserts der Klone pUC3D6HC (SEQ ID NO: 1) bzw. pUC3D6LC (SEQ ID NO: 2) wurden die Übergangsstellen zwischen der Region des Leaderpeptids und der variablen Region, sowie zwischen der variablen Region und der konstanten Region identifiziert. Durch Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese (in vitro mutagenesis system, Amersham, UK) wurden an diesen Übergangsstellen die folgenden
30 Mutationen durchgeführt (siehe auch A-D):

1) Erkennungssequenzen für bestimmte Restriktionsenzyme wurden hineinmutiert. Mit Hilfe dieser Restriktionsstellen wurden die variablen Regionen der schweren bzw. der leichten Kette des Antikörpers 3D6 aus den jeweiligen Plasmiden herausgeschnitten.

5

2) Die für die spätere Expression benötigten Start- und Stopcodons wurden einmutiert.

Um die variablen Regionen des Antikörpers 3D6 mit einem Linker verknüpfen zu können, wurden zwei synthetische Oligonucleotide hergestellt, welche die beiden DNA-Stränge des Linkers bilden. Die beiden Oligonucleotide wurden so gewählt, daß, wenn sie miteinander hybridisieren, eine Doppelstrang-DNA entsteht, an deren Enden überhängende einzelsträngige DNA Regionen vorliegen, welche genau denjenigen überhängenden Enden entsprechen, die beim Schneiden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen an den oben erwähnten einmutierten Restriktionsstellen entstehen. Dies erlaubt die Ligation der mit Hilfe dieser Restriktionsenzyme isolierten variablen Regionen mit den synthetischen Oligonucleotiden des Linkers.

20 → Leader | Variable Region →
 → K G V Q C | E V Q L V →
 141 AAA GGT GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG GTG 170 Wildtyp
 AAA GAA TTC CCC ATG GAA GTG CAG CTG GTG mutiert
 ** * ** ***
 EcoRI NcoI
 Start

25 A: Mutation am Übergang zwischen der Leaderregion und der variablen Region der schweren Kette des Antikörpers 3D6 (SEQ ID NO: 1). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die kodierten Aminosäuren in der Wildtyp-DNA sind angeführt, außerdem die durch die Mutation entstandenen Restriktionsstellen EcoRI und NcoI sowie das Startcodon ATG.

30

→ variable Region | konstante Region →
 → V T V S S | A S T K G →
 519 GTC ACC GTC TCT TCA GCC TCC ACC AAG GGC 548 Wildtyp
 5 GTC ACC GTC TCT TCA GGA TCC ACC AAG GGC mutiert
 **
 BamHI

B: Mutation am Übergang zwischen der variablen Region und der konstanten Region der schweren Kette des Antikörpers 3D6 (SEQ ID NO: 1). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die kodierten Aminosäuren in der Wildtyp-DNA sind angeführt,
 10 außerdem die durch die Mutation entstandenen Restriktionsstelle BamHI.

→ Leader Region | variable Region →
 → P G A K C | D I Q M T →
 79 CCA GGT GCC AAA TGT GAC ATC CAG ATG ACC 108
 15 CCA GGT GCC AAA GTC GAC ATC CAG ATG ACC

 SalI

C: Mutation am Übergang zwischen der Leaderregion und der variablen Region der leichten Kette des Antikörpers 3D6 (SEQ ID NO: 2). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die kodierten Aminosäuren in der Wildtyp-DNA sind angeführt, außer-
 20 dem die durch die Mutation entstandenen Restriktionsstelle SalI.

25

30

```

      → variable Region | konstante Region →
      → V   D   I   K   R | T   V   A   A   P →
397 GTG GAT ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA 426
      GTG GAT ATC AAA CGA TAA GCT TCT GCA CCA
                                ***  **  *
5                               HindIII
                                Stop

```

D: Mutation am Übergang zwischen der variablen Region und der konstanten Region der leichten Kette des Antikörpers 3D6 (SEQ ID NO: 2). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die kodierten Aminosäuren in der Wildtyp-DNA sind angeführt, außerdem die durch die Mutation entstandenen Restriktionsstelle HindIII sowie das Stop-codon TAA.

Durch Ligation der 3 entsprechend vorbehandelten Fragmente (V_H , Linker, V_D) miteinander wurde ein Gen erhalten, welches an den Übergangsstellen zwischen den variablen Regionen und dem Linker noch die hineinmutierten Restriktionsstellen trug, welche Nucleotide beinhalten, die nicht den an diesen Stellen natürlich vorkommenden Nucleotiden entsprechen. Dadurch ergab sich auch eine veränderte Aminosäuresequenz (siehe E und F).

Um die ursprüngliche Aminosäuresequenz wiederherzustellen, wurde an den erwähnten Übergangsstellen durch einen neuerlichen Mutationsvorgang die erwünschte DNA Sequenz hergestellt (siehe E und F).

→					VH		Linker	→						
							* **							
380	GTC	ACC	GTC	TCT	TCA	GGA	TCC	GGT	GGC	TCG	GGC	412		
	GTC	ACC	GTC	TCT	TCA	GGT	GGC	GGT	GGC	TCG	GGC			
→	V	T	V	S	S	G	G	G	G	S	G	→		

5 E: DNA Sequenz der Verknüpfungsstelle VH - Linker vor und nach der Rückmu-
tation zur Wiederherstellung der natürlichn Aminosäuresequenz im Bereich der VH Re-
gion (SEQ ID NO: 3). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die endgültige Ami-
nosäuresequenz ist angegeben.

10

```

      →                               Linker | VL      →
                               ***|
422 TCG GGT GGC GGC GGA GTC GAC ATC CAG ATG 451
    TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC CAG ATG
    → S  G  G  G  G  S  D  I  Q  M →

```

F: DNA Sequenz der Verknüpfungsstelle Linker - VL vor und nach der Rückmutation zur Wiederherstellung der natürlichen Aminosäuresequenz im Bereich der VL Region (SEQ I2D NO: 3). Mutierte Basen sind mit "*" gekennzeichnet. Die endgültige Aminosäuresequenz ist angegeben.

20 Mit Hilfe dieser Methoden wurde also ein Gen konstruiert, daß die Struktur V_H -
Linker - V_L besitzt. Dieses Konstrukt wird als sc3D6 (single-chain 3D6) bezeichnet, und
wurde in den Klonierungsvektor pUC19 inseriert (SEQ ID NO: 3). Der resultierende
Vektor trägt die Bezeichnung **pUCsc3D6**.

25 Das sc3D6-Gen wurde aus dem Plasmid pUCsc3D6 durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten, und in den bakteriellen Expressionsvektor pKK223-3 (Pharmacia) inseriert, welcher den mit Isopropyl- β thio-galactosid (IPTG) induzierbaren tac-Promoter enthält. Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pKKsc3D6 und wurde in den E.coli Stamm JM105 transformiert.

Kultivierung der Bakterien

Die transformierten Bakterien wurden in einem Laborfermenter bis zu einer OD_{600} von 2,0 in LB Nährmedium (5) kultiviert. Danach erfolgte die Induktion der Expression 5 durch Zugabe von Isopropylthiogalaktosid (IPTG). Die Bakterien wurden 3 Stunden in Gegenwart von IPTG weiterkultiviert, sodann durch Zentrifugation geerntet und bei -80°C gelagert. Danach wurde das Protein extrahiert und gereinigt.

Extraktion und Reinigung

10

Für jeden Versuchsansatz wurden 10 g Biomasse (Naßgewicht) eingesetzt. Die Zellen wurden mittels Lysozym im Kombination mit einem osmotischen Schock aufgeschlossen und dann bei -20°C eingefroren. Die gefrorene E. coli-Paste wird in kleine Stücke kleine Stücke gebrochen und mit STE-Puffer (10mM Tris, 100mM NaCl, 1mM 15 EDTA, pH 8,0) wird eine 10%-ige Suspension bereitet. Zu dieser Suspension wird ein Aufschlußcocktail, der Nukleasen, Lysozym und Inhibitoren enthält, hinzugefügt (siehe Tabelle 1).

Diese E.coli-Suspension wird 15 Minuten bei 42°C inkubiert. Durch Zugabe von 20 Triton-X-100 (Endkonzentration 0,5%) und einer neuerlichen fünfminütigen Inkubation bei 42°C werden die Zellen lysiert.

Ernten der Inclusionbodies

25 Das Sediment wird in STE-Puffer resuspendiert und 8 h bei 4°C gerührt. Die Inclusionbodies werden durch Zentrifugation angereichert. Hierzu wird ein Glycerinkissen (50% Glycerin/in Phosphate Buffered Saline (PBS)) in Zentrifugenröhrchen vorgelegt, mit dem gleichen Volumen Suspension überschichtet und zentrifugiert. (30 Minuten, 6000 rpm, 4°C , JA-20 Rotor, J2-21 Zentrifuge, Fa. Beckman).

30

Lösen der Inclusion bodies

Die angereicherten Inclusionbodies werden in 6M GuHCl (Guanidinhydrochlorid) in PBS, pH 8,3 unter Rühren bei 4°C (12h) gelöst. Anschließend wird der Proteingehalt 5 photometrisch bestimmt.

Refolding

Das in GuHCl gelöste Protein wird in Gegenwart von Fremdproteinen umgefaltet. 10 Zunächst erfolgte eine Proteinbestimmung. Die gelösten Inclusionbodies werden mit Refolding-Puffer (GuHCl 1M, Glutathion reduziert 30mM, Glutathion oxidiert 3mM, EDTA 100µM, in PBS, pH 8,3) so verdünnt, daß die Endkonzentration 80 mg Protein/l beträgt.

15 Das Verdünnen der gelösten Inclusionbodies erfolgt im Labormaßstab unter Verwendung einer Burette durch langsames Zutropfen der Proteinlösung in den Refolding Buffer. Man arbeitet am besten bei 37°C.

Die Rückfaltung wurde mittels Reversed-phase HPLC verfolgt. Dazu wurden Pro- 20 ben entnommen, der pH-Wert auf 5,5 gestellt, um ein weiteres Refolding zu unterbinden, die Proben zentrifugiert (Millipore Tischzentrifuge, 4700 rpm, Zimmertemperatur), sterilfiltriert (Porenweite 0,22 µm, low protein binding), falls nötig aufkonzentriert (Millipore, Tischzentrifuge, 4700 rpm, 20°C) und jeweils 250 µl mittels Reversed Phase Chromatography HPLC analysiert (Nucleosil 300, 5 µm. 4x125 mm., Fa. Macherey und 25 Vogel, BRD. Ein linearer Gradient 0,1 % TFA / Acetonitril 10 - 60 % wurde innerhalb von 40 Minuten an die Säule angelegt).

Der umgefaltete sc3D6 wird ultradiafiltriert. Es wird eine 10000 Dalton cutoff Polysulfonmembrane verwendet. Die diafiltrierte Proteinlösung wird auf einen Anionen- 30 tauscher aufgetragen und dann mit 100 mM NaCl von der Säule eluiert.

Der sc3D6 wird mit Sephadex G-25 (Fa. Pharmacia, Schweden) Gelfiltration entsalzt und nach der Methode von Nakane et al. (17) mit alkalischer Phosphatase konjugiert.

5 Das gereinigte sc3D6 Protein wurde durch SDS-PAGE kontrolliert (Abbildung 7). Zum Nachweis der Funktionalität des sc3D6 Proteins wurde ein Western Blot Test mit HIV-1-Teststreifen (Fa. BioRad, USA) durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde ein analoger Test mit dem aus tierischen Zellen isolierten, natürlichen Antikörper durchgeführt. Als negative Kontrolle diente eine Präparation von gesamt-Protein aus E.coli. Das
10 Ergebnis dieses Tests war positiv und ist in Abbildung 8 gezeigt.

Reinigung von sc3D6 Protein mittels Affinitätschromatographie

Mit dem entsprechend gereinigten sc3D6 Protein wurde ein Kaninchenserum unter Standardbedingungen mit komplettem Freundschens Adjuvans hergestellt. Mit Hilfe von
15 CM-Sephrose Fast Flow Chromatographie (Fa. Pharmacia, Schweden) wurde die IgG Fraktion aus dem Kaninchenserum gewonnen. Die Spezifität der Antikörper wurde mittels ELISA festgestellt. Mit Hilfe eines Peptidsynthesizers wurde das 15 Aminosäuren lange Linkerpeptid (Sequenz: GGGSGGGSGGGGS) hergestellt und anschließend
20 mittels Carbodiimidkondensation mit Rinderserumalbumin (BSA) im molaren Verhältnis von 6:1 konjugiert. Mit diesem Konjugat wurden Mikrotiterplatten beschichtet. Die Serumprobe wurde in den beschichteten Mikrotiterplatten inkubiert und der gebundene Antikörper wurde mit einem Peroxidase-markierten Ziege-Anti-Kaninchen IgG nachgewiesen. Das derartig hergestellte und überprüfte anti-sc3D6 IgG an eine BrCN aktivierte
25 Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Schweden) gebunden. Das nicht gebundene Material wurde ausgewaschen. Ein vorgereinigter Extrakt von sc3D6 Protein, der wie oben beschrieben rückgefaltet und mit Sephadex G-25 (Fa. Pharmacia, Schweden) entsalzt wurde, wurde auf die anti-sc3D6 Säule aufgetragen. Das nicht gebundene Material wurde ausgewaschen und das spezifisch gebundene sc3D6 Protein wurde mit einem 0,1M Glycin HCl
30 Puffer pH 2,5 eluiert. Anschließend wurde das Eluat mit 1M Tris Puffer neutralisiert

und sc3D6 Protein wie beschrieben auf mittels SDS-Elektrophorese charakterisiert und mittels Western Blot auf Funktionalität überprüft.

Eine andere Methode zur immunaffinitätschromatographischen Reinigung von 5 sc3D6 Protein ist wie folgt:

Mit dem oben beschriebenen an BSA gekoppelten Linkerpeptid wurde ein Kaninchenserum mit Hilfe von komplettem Freundschens Adjuvans hergestellt. Die IgG Fraktion wurde durch CM-Sepharose Fast Flow Chromatographie (Fa. Pharmacia, Schweden) gewonnen und über eine BSA-Sepharose 4B Säule (Fa. Pharmacia, Schweden) weiterge-
10 reinigt, um die anti-BSA Antikörper zu entfernen. Das so gewonnene anti-Linker IgG wurde an eine BrCN aktivierte Sepharose 4B (Fa. Pharmacia, Schweden) gekoppelt. Ein vorgereinigter Extrakt von sc3D6 Protein, der wie oben beschrieben rückgefaltet und mit Sephadex G-25 (Fa. Pharmacia, Schweden) entsalzt wurde, wurde auf die anti-Linker
15 Säule aufgetragen. Das nicht gebundene Material wurde ausgewaschen und das spezifisch gebundene sc3D6 Protein wurde mit einem 0,1M Glycin HCl Puffer pH 3,0 eluiert. Anschließend wurde das Eluat mit 1M Tris Puffer neutralisiert und das sc3D6 Protein wie beschrieben mittels SDS-Elektrophorese charakterisiert und mittels Western Blot auf Funktionalität überprüft.

20

25

30

Immunaффinitätschromatographische Reinigung von HIV-1 gp160

Zur Herstellung einer sc3D6-Immunaффinitätssäule wurde das gereinigte sc3D6 Protein auf eine 1ml NHS Säule (Fa. Pharmacia, Schweden) gebunden (lt. Protokoll der Fa. Pharmacia).

5

Die Vorreinigung des gp160 (des coat Proteins von HIV-1, welches vom Antikörper 3D6 sowie vom sc3D6 Protein spezifisch gebunden wird) wurde nach Barrett et al. (18) durchgeführt.

10

Das vorgereinigte Material, welches das rekombinante gp160 enthält, wurde über eine Ultra/Diafiltration ankonzentriert und für die sc3D6-Immunaффinitätschromatographie konditioniert. Dieses konditionierte Material wurde auf die sc3D6-Immunaффinitätssäule aufgetragen. Als Äquilibriumspuffer wurde ein 100mM Tris Puffer pH 7,4 mit 0,1% Tween 20 verwendet. Das rekombinante Antigen wurde mit 3M Rhodanid eluiert. Die Ausbeuten der einzelnen Stufen sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

15

Beispiel 2

20

Eine andere Klonierung des sc3D6, bei der das sc3D6-Gen mit dem aus Escherichia coli isolierten Gen für Alkalische Phosphatase (EcphoA) fusioniert wurde, wurde wie folgt ausgeführt:

25

Das sc3D6-Gen wurde aus dem Plasmid pUCsc3D6 durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten, und in den Vektor pEcphoAMut3 (19) inseriert. Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pAPsc3D6. Der Vektor pEcphoAMut3 enthält das aus Escherichia coli isolierte Gen für Alkalische Phosphatase (20) in welches durch Oligonucleotid-gerichtete Mutagenese am 3'-Ende der codierenden Region eine Restriktionsstelle einmutiert wurde, welche die Fusion des EcphoA-Gens mit anderen Genen erlaubt. Auf diese Weise können durch Expression eines Fusionsgens Fusionsproteine,

30

d.h. Proteine, bei denen die jeweiligen codierenden Regionen untereinander durch Peptidbindungen über Aminosäuren verknüpft sind, hergestellt werden.

Das EcphoA - sc3D6 Fusionsgen wurde aus pAPsc3D6 mit Restriktionsenzymen 5 herausgeschnitten und in den bakteriellen Expressionvektor pKK223-3 (Fa. Pharmacia, Schweden) insertiert. Das resultierende Plasmid trägt die Bezeichnung pKKAPsc3D6.

Das Plasmid pKKAPsc3D6 wurde in den Escherichia coli Stamm JM 105 transformiert und die transformierten Bakterien in LB Nährmedium (5) kultiviert. Nach Induktion mit IPTG wurde aktives EcPhoA - sc3D6 Fusionsprotein aus dem periplasmatischen 10 Raum der Bakterien wie folgt gereinigt:

Die Bakterien werden durch Zentrifugation geerntet und mit einem 10mM Tris Puffer pH 7,5, der mit 30mM NaCl versetzt ist, gewaschen. Die gewaschenen Bakterien 15 werden in 33mM Tris Puffer pH 7,5 resuspendiert und mit dem gleichen Volumen 40% Saccharoselösung in (33mM Tris Puffer) versetzt und EDTA auf eine Endkonzentration von 0,1mM zugegeben. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Bakterien abzentrifugiert und in 0,5mM MgCl₂ Lösung aufgenommen. Nach 10minütiger Inkubation bei 0°C wird ein Proteaseinhibierungscocktail, der aus PMSF und EGTA 20 besteht, zugesetzt und die Bakterien abzentrifugiert. Der Überstand wird mit 1M Tris Lösung pH 7,5 auf eine Endkonzentration von 25mM Tris gebracht. Durch diese Prozedur wird der periplasmatische Raum der E. coli Zellen freigelegt.

Durch Zentrifugation bei 12000 g wird die Proteinlösung geklärt und anschließend 25 über Ultrafiltration ankonzentriert.

Das EcPhoA - sc3D6 Protein wird mit Hydrophobic Interactionchromatographie weiter gereinigt. Eine Phenylsepharose Fast Flow (Fa. Pharmacia, Schweden) wurde mit 60% gesättigter Ammoniumsulfatlösung in 25mM Tris Puffer pH 7,5 äquilibriert. Die 30 Proteinlösung wurde abwechselnd mit dem Äquilibrierungspuffer auf die Säule aufgetra-

gen. Das sc3D6 wird mit einem linearen Gradienten von 60% Ammoniumsulfat auf 0% Ammoniumsulfat eluiert. Die Fraktionen welche das EcPhoA - sc3D6 Protein enthalten werden durch Gelfiltration entsalzt.

5 Zum Nachweis der Funktionalität des EcPhoA - sc3D6 Proteins wurde ein Western Blot Test mit HIV-1-Teststreifen (Fa. BioRad, USA) durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein analoger Test mit dem aus tierischen Zellen isolierten, natürlichen Antikörper durchgeführt. Als negative Kontrolle diente eine Präparation von gesamt-Protein aus E. coli. Das Ergebnis dieses Tests war positiv und ist in Abbildung 8 gezeigt.

10

Direkter Nachweis von HIV-1 Antigen mittels ELISA

Ein gp120-spezifischer monoklonaler Antikörper (Klon 25 C2, Accession Nr. 89120601, PHLS, Porton Down, UK) wurde auf Mikrotiterplatten (Grade I, Fa. Nunc, 15 Dänemark) beschichtet. HIV-1 hältiger Kulturüberstand (16) wurde auf die beschichteten Mikrotiterplatten aufgetragen. Als Standard wurde rekombinantes gp160 (18) verwendet.

Nach Auswaschen des ungebundenen Materials wurde das EcPhoA-sc3D6 Protein aufgetragen und inkubiert. Das ungebundene Material wurde neuerlich ausgewaschen 20 und mit p-Nitrophenylphosphat wurde das gebundene EcPhoA-sc3D6 Protein photometrisch bei 602nm nachgewiesen. In Abbildung 9 ist die Standardkurve und verschiedene Proben von HIV-1 positiven Kulturüberständen dargestellt.

Kompetitiver Anti-HIV-1 ELISA

25

Mikrotiterplatten (Grade I, Fa. Nunc, Dänemark) wurden mit einer Lösung von 10mg/ml rekombinanten gp160 (18) beschichtet. Sodann wurden die Platten mit PBS + 0,1% Tween 20 + 1% BSA gewaschen.

30

ERSATZBLATT

Eine Lösung von 5 µg/ml EcPhoA - sc3D6 Fusionsprotein wurde im Verhältnis 1:1 mit HIV-1 positiven bzw. HIV-1 negativen Seren gemischt und auf die beschichteten Platten aufgetragen. Als Kontrolle wurde mit Verdünnungspuffer gemischtes EcPhoA - sc3D6 Fusionsprotein aufgetragen und bei 37°C 60 min. inkubiert. Danach wurde das 5 ungebundene Material ausgewaschen.

Durch Zugabe von p-Nitrophenylphosphat wurde der Anteil an gebundenem Ec-PhoA - sc3D6 Protein nachgewiesen. Die entstandene Farbe wurde photometrisch bei 602nm quantifiziert. Die Inhibition der Sera wurde in Prozenten der Extinktion von Ec-10 PhoA - sc3D6 Protein ohne Serum ermittelt. Wie in Abbildung 10 dargestellt, inhibieren alle HIV-1 positiven Sera die Bindung von EcPhoA - sc3D6 Fusionsprotein an gp160. Alle HIV-1 negativen Sera zeigten weniger Inhibition als die HIV-1 positiven Sera.

Beispiel 3

15

Eine andere Expressionsart für das sc3D6 Protein, bei welcher Maus-Myelomzellen als Wirtszellen benutzt wurden, wurde wie folgt ausgeführt:

Der 3' Teil des sc3D6-Gens wurde aus dem Plasmid pUCsc3D6 (SEQ ID NO: 3) 20 durch partiellen EcoRV Verdau sowie durch kompletten HindIII Verdau isoliert (Länge des Fragments: 401 bp). Aus dem Plasmid pUC3D6HC (SEQ ID NO: 1) wurde der 3' Teil des Gens für die schwere Kette durch Schneiden mit EcoRV und HindIII entfernt. In den verbleibenden Vektor wurde das über Agarose-Gelelektrophorese isolierte und gereinigte 401 bp Fragment des sc3D6-Gens inseriert. Das so rekombinierte Gen besteht also 25 aus der Sequenz für das Leaderpeptid der schweren Kette des Antikörpers 3D6, gefolgt von der Sequenz des sc3D6 Gens. Das Plasmid trägt die Bezeichnung pLsc3D6. Diese Konstruktion erlaubt die Ausschleusung des sc3D6 Proteins in tierischen Zellen. Das codierende Gen wurde aus pLsc3D6 mit den Enzymen NcoI und HindIII isoliert, die überhängenden Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt und in die SmaI Stelle des für 30 tierische Zellen geeigneten Expressionsvektors pRcRSV (Invitrogen, USA) kloniert. Die

SmaI Stelle dieses Expressionsvektor liegt zwischen dem Long Terminal Repeat von RSV, also einem starken viralen Promoter, und Transkriptions-Terminationssequenzen, welche ursprünglich vom Rinder-Wachstumshormon stammen. Durch Insertion in diese Restriktionsstelle ist es möglich, beliebige Strukturgene in eine molekulare Umgebung zu 5 bringen, welche die Expression der Gene in tierischen Zellen erlaubt. Außerdem besitzt der Vektor pRcRSV noch einen Selektionsmarker "Neomycinresistenz", welcher die Selektion von erfolgreich transformierten tierischen Zellen in der Kultur erlaubt.

Das solcherart konstruierte Plasmid trägt die Bezeichnung pRcRSVLsc3D6. Es 10 wurde in Mausmyelomzellen der Linie P3-X63-Ag8.653 (21) transfiziert. Nach Selektion von transformierten Zellen mit dem Antibiotikum Neomycin wurden in 2 Klonierungs- und Screeningrunden insgesamt 5 Klone selektiert, welche das sc3D6 Gen exprimieren. Die Expressionslevel der einzelnen Klone wurden mittels Antigen-spezifischem ELISA getestet und liegen zwischen 0,5 und 1 ug/ml.

15

Der das sc3D6 Protein enthaltende Kulturüberstand der transfizierten Mausmyelomzellen wurde durch Zentrifugation bei 5000g in einer Becherzentrifuge geklärt. Der geklärte Kulturüberstand wurde um das 10-fache durch Ultrafiltration (Minitan, PTGC, cut off 10000 Dalton, Fa. Millipore) aufkonzentriert und mit einem 50mM Tris Puffer 20 pH 7,2 mit dem 5-fachen Volumen diafiltriert.

Die diafiltrierte Proteinlösung wurde mit Q-Sepharose Fast Flow (Fa. Pharmacia, Schweden) weitergereinigt (Äquilibrierungspuffer 50mM Tris Puffer pH 7,2). Die Elution des sc3D6 Proteins erfolgte mit 150mM NaCl. Das gereinigte Protein wurde mittels 25 Antigen-spezifischem ELISA getestet. Die Ausbeuten der einzelnen Reinigungsstufen sind in Tabelle 3 dargestellt.

30

Beispiel 4

Das Plasmid pRcRSVLsc3D6 wurde in Chinese Hamster Ovary (CHO) Zellen transfiziert. In analoger Weise wie in Beispiel 3 beschrieben, wurden transformierte Zellen selektiert und gescreent und das sc3D6 Protein aus dem Zellkulturüberstand gereinigt. Die Testung der Expressionslevels mittels Antigen-spezifischem ELISA brachte Werte zwischen 1 und 5 ug/ml Antikörper.

Beispiel 5

10

Das sc3D6-Gen wurde aus dem Plasmid pUCsc3D6 durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten und in den Hefe-Expressionsvektor pG1 (Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, USA) insertiert. In dieser Konstruktion wird das sc3D6-Gen unter die Regulation des durch Galaktose induzierbaren GAL1-Promoters gestellt. Das Konstrukt wurde in den *Saccharomyces cerevisiae* Stamm SHY2 (*trp1*⁻) transfiziert und in Medium ohne Tryptophan auf Komplementierung der Tryptophan-Auxotrophie selektiert. Positive Transformanten wurden isoliert und zur Produktion von sc3D6 Protein herangezogen. Die Bedingungen für die Kultivierung des Produktionsstammes, sowie für die Isolierung, Aufarbeitung und Reinigung des Produktes erfolgten gemäß Standardprotokollen (22).

20

Beispiel 6

Das sc3D6-Gen wurde aus dem Plasmid pUCsc3D6 durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten und in den Vector pAc373 insertiert (23). Dieses rekombinante Plasmid wurde gemeinsam mit DNA des Baculovirus *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcMNPV) in die von *Spodoptera frugiperda* stammende Zelllinie Sf9 transfiziert. Die Kultivierung der Sf9 Zellen erfolgte gemäß Standardmethode, wie im Katalog der American Type Culture Collection beschrieben. 3 bis 5 Tage nach der Transfektion wurden Plaques von rekombinanten Viren mikroskopisch identifiziert und isoliert. Um sicher zu gehen, daß die isolierten rekombinanten Viren nicht durch Wildtypviren

kontaminiert sind, wurden drei weitere Plaquereinigungsvorgänge angeschlossen. Infektion von Sf9 Zellen mit rekombinantem Virus führte nach 3 bis 5 Tagen zur Lyse der infizierten Zellen, und, damit verbunden, zur Produktion von sc3D6 Protein im Überstand des Zellysats. Das sc3D6 Protein wurde aus diesem Überstand in analoger Weise wie in Beispiel 3 beschrieben gereinigt und analysiert. Auf diese Weise konnte die Funktionalität dieses rekombinanten Proteins nachgewiesen werden.

Beispiel 7

10 Die für das Protein Avidin codierende Sequenz (24) wurde durch synthetische Oligonucleotide als synthetisches Gen hergestellt, und zwar so, daß zusätzlich am 5'-Ende des Gens die Sequenz des Leaderpeptids für E. coli Alkalische Phosphatase (20) und am 3'-Ende eine Polylinkerregion zur Insertierung anderer Gene vorliegt. In dieser Polylinkerregion insertierte Gene werden unter geeigneten Bedingungen als Fusionspro-
15 teine mit Avidin als Fusionspartner exprimiert. Mit Hilfe des am 5' Ende befindlichen Leaders werden diese Fusionsproteine in aktiver Form in den periplasmatischen Raum von Escherichia coli ausgeschleust. Dieses Konstrukt wurde in eine geeignete Restriktionsstelle des bakteriellen Expressionsvektors pET-3a (25) insertiert, welcher zur Expression klonierter Gene den Bacteriophage T7- ϕ 10 Promotor sowie den ϕ Terminator enthält.
20 Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pET-3a-Av.

Der Bacteriophage T7- ϕ 10 Promotor hat die Eigenschaft, in Abwesenheit der Bacteriophage T7 RNA Polymerase in E. coli Zellen nicht transkribiert zu werden. Wird jedoch beispielsweise eine dichtgewachsene E. coli Kultur mit einem Phagen-Vektor,
25 welcher die genetische Information für die T7 Polymerase trägt, infiziert, so führt die dadurch produzierte T7 Polymerase zur Expression von Genen, die beispielsweise in Vektoren wie dem oben beschriebenen kloniert vorliegen. Diese Eigenschaft ist für die Expression von Avidin und Avidin-Fusionsproteinen in E. coli sehr wichtig, da das Avidin für wachsende E. coli Kulturen toxisch ist.

Das sc3D6 Gen wurde aus dem Vektor pUCsc3D6 durch Restriktionsenzyme herausgeschnitten und in die Polylinkerregion des Vektors pET-3a-Av inseriert. Der resultierende Vektor trägt die Bezeichnung pET-3a-Av-sc3D6. Geeignete E. coli Wirtszellen (z.B. HMS174) wurden mit diesem Vektor transformiert und kultiviert. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatte, wurde mit dem Bacteriophagen CE6 (Lambda cIts857Sam7) (25) welcher das Bacteriophagen T7 Gen1 trägt, infiziert. Die dadurch gebildete T7 Polymerase führte zur Expression des Avidin-sc3D6 Fusionsproteins im periplasmatischen Raum der E. coli. Sobald die Expression ihr Maximum erreicht hatte (je nach Kulturbedingungen zwischen 3 und 12 Stunden nach Infektion mit dem Phagen), wurde das rekombinante Protein in analoger Weise wie in Beispiel 2 beschrieben freigesetzt und durch Ultrafiltration ankonzentriert.

Die konzentrierte Proteinlösung wird über Sephacryl S 200 (Fa. Pharmacia) weitergereinigt und ein zweites Mal mittels Ultradiafiltration ankonzentriert. Diese Lösung wird auf eine Biotinsäule aufgebracht. Das entsprechende Fusionsprotein Avidin-sc3D6 bleibt spezifisch gebunden. Die Verunreinigungen werden ausgewaschen. Die so hergestellte Affinitätssäule wurde für die Reinigung von rekombinantem gp160 analog Beispiel 1 eingesetzt, das heißt, die vorgereinigte Proteinlösung nach Barrett et al. (18) wurde auf die Affinitätssäule aufgetragen und nach Auswaschen des ungebundenen Materials wurde das rekombinante gp160 mit 3M Rhodanid eluiert. Die dabei erzielten Ausbeuten verhalten sich analog den in Tabelle 2 dargestellten Ergebnissen.

SEQ ID NO: 1

ART DER SEQUENZ: Nucleotide mit entsprechendem Protein

SEQUENZLÄNGE: 1548 Basenpaare

5

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: zirkulär

ART DES MOLEKÜLS: Plasmid-DNA mit Insert von humaner cDNA

10 URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

ORGANISMUS: Mensch

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT:

NAME DER ZELLINIE: 3D6

15	MERKMALE:	von	1 bis	36 bp	Plasmid pUC19 Polylinker
		"	37 "	1527 "	Insert schwere Kette des Antikörpers 3D6
		"	37 "	98 "	5' nicht translatierte Region
		"	99 "	1526 "	codierende Region
		"	99 "	155 "	Signalpeptid
20		"	156 "	1526 "	reifes Peptid
		"	156 "	533 "	variable Region
		"	156 "	245 "	Framework 1
		"	246 "	260 "	complementarity determining region 1
		"	261 "	302 "	Framework 2
25		"	303 "	353 "	complementarity determining region 2
		"	354 "	449 "	Framework 3
		"	450 "	500 "	complementarity determining region 3
		"	501 "	533 "	Framework 4
		"	534 "	1526 "	konstante Region
30		"	1527 "	1547 "	Plasmid pUC 19 Polylinker

Eigenschaften: cDNA Klon der schweren Kette des Antikörpers 3D6
insertiert in das Plasmid pUC19.

35	GTGAATTCGA GCTCGGTACCC GGGGATCCTC TAGAGTCCCA GCCCTGAGAT TCCCAGGTGT	60
	TTCCATTCAG TGATCAGCACT GAACACAGAG GACTCACC	98
	ATG GAG TTG GGA CTG AGC TGG ATT TTC CTT TTG GCT ATT TTA AAA	143
	MET Glu Leu Gly Leu Ser Trp Ile Phe Leu Leu Ala Ile Leu Lys	
40	-15 -10 -5	
	GGT GTC CAG TGT GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG	188
	Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu	
	1 5 10	

ERSATZBLATT

	GTA CAG CCT GGC AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA	233
	Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly	
	15 20 25	
5	TTC ACC TTT AAT GAT TAT GCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA	278
	Phe Thr Phe Asn Asp Tyr Ala MET His Trp Val Arg Gln Ala Pro	
	30 35 40	
10	GGG AAG GGC CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATA AGT TGG GAT AGT AGT	323
	Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Ser	
	45 50 55	
	AGT ATA GGC TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC	368
15	Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser	
	60 65 70	
	AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG	413
	Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu	
20	75 80 85	
	AGA GCT GAG GAC ATG GCC TTA TAT TAC TGT GTA AAA GGC AGA GAT	458
	Arg Ala Glu Asp MET Ala Leu Tyr Tyr Cys Val Lys Gly Arg Asp	
	90 95 100	
25	TAC TAT GAT AGT GGT GGT TAT TTC ACG GTT GCT TTT GAT ATC TGG	503
	Tyr Tyr Asp Ser Gly Gly Tyr Phe Thr Val Ala Phe Asp Ile Trp	
	105 110 115 120	
30	GGC CAA GGG ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA GCC TCC ACC AAG GGC	548
	Gly Gln Gly Thr MET Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly	
	125 130 135	
	CCA TCG GTC TTC CCC CTG GCA CCC TCC TCC AAG AGC ACC TCT GGG	593
35	Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly	
	140 145 150	
	GGC ACA GCA GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC TTC CCC GAA	638
	Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu	
40	155 160 165	
	CCG GTG ACG GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG	683
	Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val	
	170 175 180	

	CAC ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC	728
	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu	
	185 190 195	
5		
	AGC AGC GTG GTG ACC GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACC CAG ACC	773
	Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	
	200 205 210	
10	TAC ATC TGC AAC GTG AAT CAC AAG CCC AGC AAC ACC AAG GTG GAC	818
	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp	
	215 220 225	
3		
	AAG AAA GTT GAG CCC AAA TCT TGT GAC AAA ACT CAC ACA TGC CCA	863
15	Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro	
	230 235 240	
	CCG TGC CCA GCA CCT GAA CTC CTG GGG GGA CCG TCA GTC TTC CTC	908
	Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu	
20	245 250 255	
	TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACC CTC ATG ATC TCC CGG ACC CCT	953
	Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu MET Ile Ser Arg Thr Pro	
	260 265 270	
25		
	GAG GTC ACA TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAC GAA GAC CCT GAG	998
	Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu	
	275 280 285	
	GTC AAG TTC AAC TGG TAC GTG GAC GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC	1043
30	Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala	
	290 295 300	
	AAG ACA AAG CCG CGG GAG GAG CAG TAC AAC TCC ACG TAC CGT GTG	1088
	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val	
35	305 310 315	
	GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC CAG GAC TGG CTG AAT GGC AAG	1133
	Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys	
	320 325 330	
40		
	GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GCC CTC CCA GCC CCC ATC	1178
	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	
	335 340 345	

ERSATZBLATT

	GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA GGG CAG CCC CGA GAA CCA CAG	1223
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln	
	350 355 360	
5	GTG TAC ACC CTG CCC CCA TCC CGG GAT GAG CTG ACC AAG AAC CAG	1268
	Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln	
	365 370 375	
	GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC AAA GGC TTC TAT CCC AGC GAC ATC	1313
10	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile	
	380 385 390	
	GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG AAC AAC TAC AAG	1358
	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
15	395 400 405	
	ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC	1403
	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr	
	410 415 420	
20	AGC AAG CTC ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG CAG GGG AAC GTC	1448
	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val	
	425 430 435	
25	TTC TCA TGC TCC GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA	1493
	Phe Ser Cys Ser Val MET His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
	440 445 450	
	CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CCG GGT AAA TGA	1526
30	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Stop	
	455 460	
	GACCTGCAGG CATGCAAGCT T	1547

35

40

ERSATZBLATT

SEQ ID NO: 2

ART DER SEQUENZ: Nucleotide mit entsprechendem Protein

SEQUENZLÄNGE: 945 Basenpaare

5 STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: zirkulär

ART DES MOLEKÜLS: Plasmid-DNA mit Insert von humaner cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

10 ORGANISMUS: Mensch

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT:

NAME DER ZELLINIE: 3D6

	MERKMALE: von	1 bis	21 bp	Plasmid pUC19 Polylinker
15	"	22 "	732 "	Insert leichte Kette des Antikörpers 3D6
	"	22 "	27 "	5` nicht translatierte Region
	"	28 "	732 "	codierende Region
	"	28 "	93 "	Signalpeptid
	"	94 "	732 "	reifes Peptid
20	"	94 "	408 "	variable Region
	"	94 "	162 "	Framework 1
	"	163 "	195 "	complementarity determining region 1
	"	196 "	240 "	Framework 2
	"	241 "	261 "	complementarity determining region 2
25	"	262 "	357 "	Framework 3
	"	358 "	378 "	complementarity determining region 3
	"	379 "	408 "	Framework 4
	"	409 "	732 "	konstante Region
	"	733 "	905 "	3`nicht translatierte Region
30	"	906 "	945 "	Plasmid pUC 19 Polylinker

Eigenschaften: cDNA Klon der leichten Kette des Antikörpers 3D6
insertiert in das Plasmid pUC19.

35

GTGAATTCGA GCTCGGTACC CCACAGC 27

ATG GAC ATG AGG GTC CCC GCT CAG CTC CTG GGG CTC CTG CTG CTC 72

MET Asp MET Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu

40 -18 -13 -8

TGG CTC CCA GGT GCC AAA TGT GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCT 117

Trp Leu Pro Gly Ala Lys Cys Asp Ile Gln MET Thr Gln Ser Pro

-3 3 8

ERSATZBLATT

	TCC ACC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC	162
	Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys	
	13 18 23	
5	CGG GCC AGT CAG AGT ATT AGT AGG TGG TTG GCC TGG TAT CAG CAG	207
	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln	
	28 33 38	
10	AAA CCA GGG AAA GTC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAG GCA TCT AGT	252
	Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser	
	43 48 53	
	TTA GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG	297
	Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
15	58 63 68	
	ACA GAA TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAT GAT TTT	342
	Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe	
	73 78 83	
20	GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAT TCT TTC GGC CCT	387
	Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Phe Gly Pro	
	88 93 98	
25	GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA CGA ACT GTG GCT GCA CCA TCT GTC	432
	Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val	
	103 108 113	
	TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT GGA ACT GCC	477
30	Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala	
	118 123 128	
	TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA	522
	Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys	
35	133 138 143	
	GTA CAG TGG AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG	567
	Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln	
	148 153 158	
40	GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG GAC AGC ACC TAC AGC CTC	612
	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu	
	163 168 173	

AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA	657
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys	
178 183 188	
5 GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC	702
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val	
193 198 203	
ACA AAG AGC TTC AAC AGG GGA GAG TGT TAG	732
10 Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Stop	
208	
CACCTGCTCC TCAGTTCCAG CCTGACCCCC TCCCATCCTT TGGCCTCTGA CCCTTTTCC	792
ACAGGGGACC TACCCCTATT GCGGTCCTCC AGCTCATCTT TCACCTCACC CCCCTCCTCC	852
15 TCCTTGGCTT TAATTATGCT AATGTTGGAG GAGAATGAAT AAATAAAGTG AATGGGGATC	912
CTCTAGAGTC GACCTGCAGG CATGCAAGCT TGG	945

20

25

30

35

40

ERSATZBLATT

SEQ ID NO: 3

ART DER SEQUENZ: Nucleotide mit entsprechendem Protein

SEQUENZLÄNGE: 776 Basenpaare

5 STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: zirkulär

ART DES MOLEKÜLS: Plasmid-DNA mit Insert von engineerter humaner cDNA

URSPRÜNGLICHE HERKUNFT

10 ORGANISMUS: Mensch

UNMITTELBARE EXPERIMENTELLE HERKUNFT:

NAME DER ZELLINIE: 3D6

MERKMALE:

15

von	1 bp	bis	13 bp	Plasmid pUC19 Polylinker
"	14 "	760 "		Insert sc3D6
"	14 "	16 "		Start codon
	14 "	394 "		variable region heavy chain
20 "	17 "	106 "		Framework 1 heavy chain
"	107 "	121 "		complementarity determining region 1 heavy chain
"	122 "	163 "		Framework 2 heavy chain
"	164 "	214 "		complementarity determining region 2 heavy chain
"	215 "	310 "		Framework 3 heavy chain
25 "	311 "	361 "		complementarity determining region 3 heavy chain
"	362 "	394 "		Framework 4 heavy chain
"	395 "	440 "		Linker
"	441 "	760 "		variable region light chain
"	441 "	508 "		Framework 1 light chain
30 "	509 "	542 "		complementarity determining region 1 light chain
"	543 "	588 "		Framework 2 light chain
"	589 "	607 "		complementarity determining region 2 light chain
"	608 "	703 "		Framework 3 light chain
"	704 "	724 "		complementarity determining region 3 light chain
35 "	725 "	757 "		Framework 4 light chain
"	758 "	760 "		Stop codon
"	761 "	776 "		Plasmid pUC 19 Polylinker

40

Eigenschaften: Klon des engineernten single-chain Fv-Fragments des Antikörpers 3D6 insertiert in das Plasmid pUC19.

	AAAAGAATTC CCC	13
5		
	ATG GAA GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC TTG GTA CAG CCT	58
	MET Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro	
	5 10 15	
10	GGC AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTT	103
	Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe	
	20 25 30	
	AAT GAT TAT GCC ATG CAC TGG GTC CGG CAA GCT CCA GGG AAG GGC	148
15	Asn Asp Tyr Ala MET His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly	
	35 40 45	
	CTG GAG TGG GTC TCA GGT ATA AGT TGG GAT AGT AGT AGT ATA GGC	193
	Leu Glu Trp Val Ser Gly Ile Ser Trp Asp Ser Ser Ser Ile Gly	
20	50 55 60	
	TAT GCG GAC TCT GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAC	238
	Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn	
	65 70 75	
25	GCC AAG AAC TCC CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGT CTG AGA GCT GAG	283
	Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln MET Asn Ser Leu Arg Ala Glu	
	80 85 90	
	GAC ATG GCC TTA TAT TAC TGT GTA AAA GGC AGA GAT TAC TAT GAT	328
30	Asp MET Ala Leu Tyr Tyr Cys Val Lys Gly Arg Asp Tyr Tyr Asp	
	95 100 105	
	AGT GGT GGT TAT TTC ACG GTT GCT TTT GAT ATC TGG GGC CAA GGC	373
	Ser Gly Gly Tyr Phe Thr Val Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly	
35	110 115 120	
	ACA ATG GTC ACC GTC TCT TCA GGT GGC GGT GGC TCG GGC GGT GGT	418
	Thr MET Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly	
	125 130 135	
40		
	GGG TCG GGT GGC GGC GGA TCT GAC ATC CAG ATG ACC CAG TCT CCT	463
	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Gln MET Thr Gln Ser Pro	
	140 145 150	

ERSATZBLATT

TCC ACC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA GTC ACC ATC ACT TGC 508
 Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 155 160 165

5 CGG GCC AGT CAG AGT ATT AGT AGG TGG TTG GCC TGG TAT CAG CAG 553
 Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Arg Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln
 170 175 180

AAA CCA GGG AAA GTC CCT AAG CTC CTG ATC TAT AAG GCA TCT AGT 598
 10 Lys Pro Gly Lys Val Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Ala Ser Ser
 185 190 200

TTA GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG 643
 Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
 15 205 210 215

ACA GAA TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAT GAT TTT 688
 Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe
 220 225 230

20 GCA ACT TAT TAC TGC CAA CAG TAT AAT AGT TAT TCT TTC GGC CCT 733
 Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser Phe Gly Pro
 235 240 245

25 GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA CGA TAA 760
 Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Stop---
 250

GCTTCTGCAC CATCTG 776

30

35

40

TABELLEN

5

Substanz	Endkonzentration
Lysozym	0,2 mg/ml
10 RNase	15 U/ml
DNase	15 U/ml
EDTA	100 mM

15

Tabelle 1: Endkonzentration der Aufschlußchemikalien in der Zellsuspension.

20

25

Stufe	Volumen(ml)	Protein (mg)	gp160 (mg)	Ausbeute (%)
Extraktion	7000	38200	600	100
30 Lentil-Sepharose	520	1000	372	62
sc3D6-Affinitäts- chromatographische	130	148	144	24

35

Tabelle 2: Ausbeuten der einzelnen Stufen der immunaffinitätschromatographischen Reinigung von rekombinantem gp160 mit sc3D6 als Affinitätsligand

40

ERSATZBLATT

	Stufe	Volumen (ml)	Protein (mg)	Titer
5	Kulturüberstand	3500	7600	1:256
	Ultradiafiltration	350	5300	1:2048
	Q-Sepharose	50	72	1:10000

10

Tabelle 3: Ausbeuten der einzelnen Stufen der Reinigung von sc3D6 Protein aus dem Kulturüberstand von transformierten Mausmyelomzellen.

15

20

25

30

35

40

ERSATZBLATT

LITERATUR

1. Grunow, R., S. Jahn, T. Porstmann, S. T. Kiessig, H. Steinkellner, E. Steindl, D. Mattanovich, L. Gürtler, E. Deinhardt, H. Katinger, and R. von Baehr. 1988. The high efficiency, human B cell immortalizing heteromyeloma CB-F7, J. Immunol. Methods 106:257

2. Watson, J. D., N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, and A. M. Weiner. 1987. Molecular Biology of the Gene, vol. 1 and 2, The Benjamin/Cummings Publishing 10 Company, Inc.

3. Inbar, D., J. Hochmann, and D. Givol. 1972. Localisation of antibody combining sites within the variable portions of heavy and light chains, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2659-2662

15

4. Hochman, J., D. Inbar, and D. Givol. 1973. An active antibody fragment (Fv) composed of the variable portions of heavy and light chains, Biochemistry 12:1130-1135

5. Maniatis, T., E. F. Fritsch, and J. Sambrook. 1982. Molecular Cloning, A 20 Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory

6. Kabat, E. A., T. T. Wu, M. Reid-Miller, H. M. Perry, and K. S. Gottesman. 1987. Sequences of proteins of immunological interest, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service

25

7. Neuberger, M. S. 1983. Expression and regulation of immunoglobulin heavy chain gene transfected into lymphoid cells, EMBO J. 2:1373-1378

8. Wood, C. R., M. A. Boss, I. H. Kenten, I. E. Calvert, and N. A. Roberts. 1985. The synthesis and in vitro assembly of functional antibodies in yeast, *Nature (London)* 314:446-449
- 5 9. Boss, M. A., I. A. Kenten, C. R. Wood, and I. S. Emtage. 1984. Assembly of functional antibodies from immunoglobulin heavy and light chains synthesised in *E. coli*, *Nucl. Acids Res.* 12:3791-3806
10. Skerra, A., and A. Plückthun. 1988. Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*, *Science* 240:1038-1041
11. Better, M., P. Chang, R. R. Robinson, and A. H. Horwitz. 1988. *Escherichia coli* secretion of an active chimeric antibody fragment, *Science* 240:1041-1043
- 15 12. Huston, I. S., D. Levinson, M. Mudgett-Hunter, M.-S. Tai, J. Novotny, M. N. Margolies, R. J. Ridge, R. E. Brucoleri, E. Haber, R. Crea, and H. Oppermann. 1988. Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue in *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883
- 20 13. Bird, R. E., K. D. Hardman, I. W. Jacobson, S. Johnson, B. M. Kaufman, S.-M. Lee, T. Lee, S. H. Pope, G. S. Riordan, and M. Whitlow. 1988. Single-Chain Antigen-Binding Proteins, *Science* 242:423-426
- 25 14. Döpel, S.-H., T. Porstmann, R. Grunow, A. Jungbauer, and R. v. Baehr. 1989. Application of a human monoclonal antibody in a rapid competitive anti-HIV ELISA, *J. Immunol. Methods* 116:229-233

15. Döpel, S.-H., T. Porstmann, P. Henklein, and R. von Baehr, 1989. Fine mapping of an immunodominant region of the transmembrane protein of the Human Immunodeficiency Virus (HIV-1) by different peptides and their use in anti-HIV ELISA, J. Virol. Meth. 25:167-178

5

16. Junghauer, A., C. Tauer, E. Wenisch, E. Steindl, M. Purtscher, M. Reiter, F. Unterluggauer, A. Buchacher, K. Uhl, and H. Katinger, 1989. Pilot Scale Production of a Human Monoclonal Antibody Against Human Immunodeficiency Virus HIV-1, J. Biochem. Biophys. Meth. 19(2-3):223-240

10

17. Nakane, P. K., and A. Kawaoi, 1974. Peroxidase labeled antibody: a new method of conjugation, J. Histochem. Cytochem. 22:1084-1091

18. Barrett, N., A. Mitterer, W. Mundt, J. Eibl, M. Eibl, R. C. Gallo, B. Moss,
15 and F. Dorner, 1989. Large-scale production and purification of a Vaccinia recombinant-derived HIV-1 gp160 and analysis of its immunogenicity, Aids Res. and Human Retroviruses 5(2):159-171

19. Kohl, J., F. Rüker, G. Himmler, D. Mattanovich, and H. Katinger, 1990.
20 Engineered gene for Escherichia coli alkaline phosphatase for the construction of translational fusions, Nucl. Acids Res. 18(4):1069

20. Shuttleworth, H., J. Taylor, and N. Minton, 1986. Sequence of the gene for alkaline phosphatase from Escherichia coli JM83, Nucl. Acids Res. 14(21):8689

25

21. Kearney, J. F., A. Radbruch, B. Liesegang, and K. Rajewsky, 1979. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines, J. Immunol. 123:1548-1550

30

22. Glover, D.M.. 1987. DNA cloning. A practical approach, vol. 1, 2 and 3, IRL Press Oxford, Washington DC

23. Smith, G. E., M. D. Summers, and M. J. Fraser;. 1983. Production of human beta interferon in insect cells infected with a baculovirus expression vector, Mol. Cell. Biol. 3:2156-2165

24. Gope, M. L., R. A. Keinänen, P. A. Kristo, O. M. Conneely, W. G. Beattie, T. Zarucki-Schulz, B. W. O'Malley, and M. S. Kulomaa. 1987. Molecular cloning of the chicken avidin cDNA, Nucl. Acids. Res. 15(8):3595-3606

25. Studier, F. W., and B. A. Moffatt. 1986. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, J. Mol. Biol. 189:113

15

20

25

30

PATENTANSPRÜCHE:

- 1.) An ein komplexes virales Antigen von HIV-1 bindendes rekombinantes Protein, dadurch gekennzeichnet, daß es die variablen Regionen eines von der Zelllinie 3D6 stammenden Antikörpers enthält.
- 2.) Rekombinantes Protein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die variable Region der schweren Kette gemäß SEQ ID NO: 1 enthält.
- 10 3.) Rekombinantes Protein nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es die variable Region der leichten Kette gemäß SEQ ID NO: 2 enthält.
- 4.) Rekombinantes Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es gemäß SEQ ID NO: 3 aufgebaut ist, wobei die variable Region der
15 schweren Kette mit der variablen Region der leichten Kette über einen Linker verbunden ist.
- 5.) Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß eine DNA Insertion sc3D6, bzw. eine mit
20 dieser Insertion hybridisierende Sequenz oder eine durch Degeneration aus dem exprimierten Protein abgeleitete Sequenz in ein Plasmid eingeführt, mit diesem Plasmid ein Wirt transformiert und das Konstrukt exprimiert wird.
- 6.) Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Proteins nach Anspruch 5,
25 dadurch gekennzeichnet, daß es als Fusionsprotein, insbesondere zusammen mit Alkalischer Phosphatase oder zusammen mit Avidin, exprimiert wird.
- 7.) Insertion zum Einsatz in dem Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Insertion sc3D6 die in SEQ ID NO: 3 angegebene Nucleotidsequenz
30 aufweist.

8.) Verfahren zur Reinigung des rekombinanten Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß spezifische Antikörper gegen das Protein und/oder gegen den Linker zwischen den beiden variablen Anteilen eingesetzt werden.

5

9.) Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die zur Reinigung eingesetzten Antikörper an einem Träger immobilisiert sind.

10.) Verfahren zur Isolierung und/oder Reinigung von HIV-1 Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß die Isolierung und/oder Reinigung durch Affinitätschromatographie erfolgt, wobei, gegebenenfalls nach entsprechender Vorreinigung, das sc3D6 Protein oder das Avidin-sc3D6 Protein als Ligand für die Affinitätschromatographie eingesetzt wird.

15 11.) Verfahren zum direkten Nachweis von HIV-1 Antigen, dadurch gekennzeichnet, daß ein Fusionsprotein eingesetzt wird, welches EcphoA-sc3D6 Protein als kombiniertes Detektions- und Signalprotein beinhaltet.

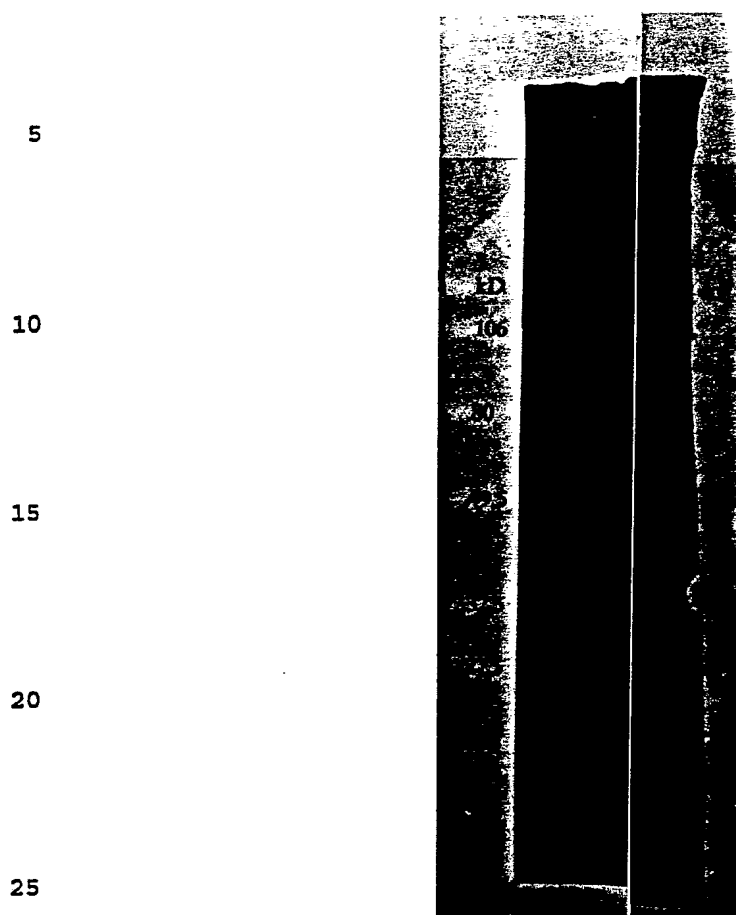
20 12.) Verfahren zum Nachweis von HIV-1-positiven Seren in kompetitiven Immunoassays, dadurch gekennzeichnet, daß ein Fusionsprotein eingesetzt wird, welches EcphoA-sc3D6 Protein als kombiniertes Detektions- und Signalprotein enthält.

25

30

ERSATZBLATT

1 / 4



30

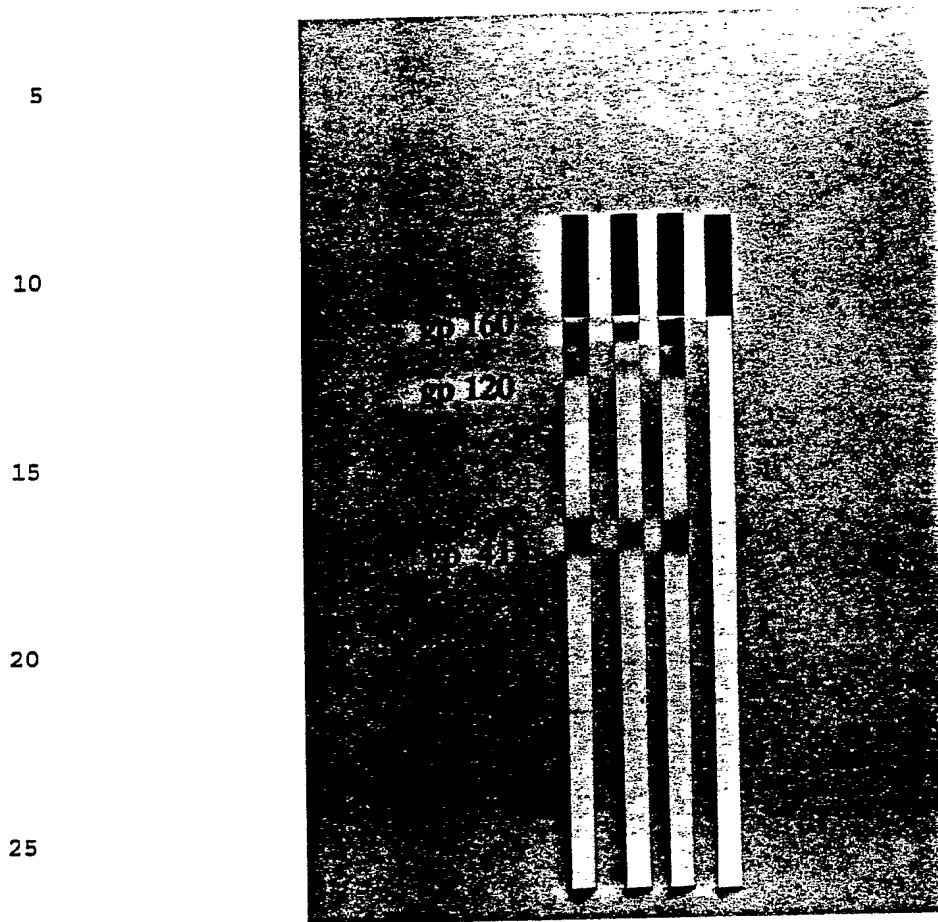
Abbildung 1: SDS Gel des gereinigten sc3D6. Molekulargewichte des verwendeten Standards sind angegeben.

35

40

ERSATZBLATT

2 / 4



30

Abbildung 2: HIV-1 Westernblot Streifen.

Antigen bindended Protein:

1. sc3D6 Protein
2. APsc3D6 Fusionsprotein
3. Antikörper 3D6
4. gesamt-Protein aus E. coli

35

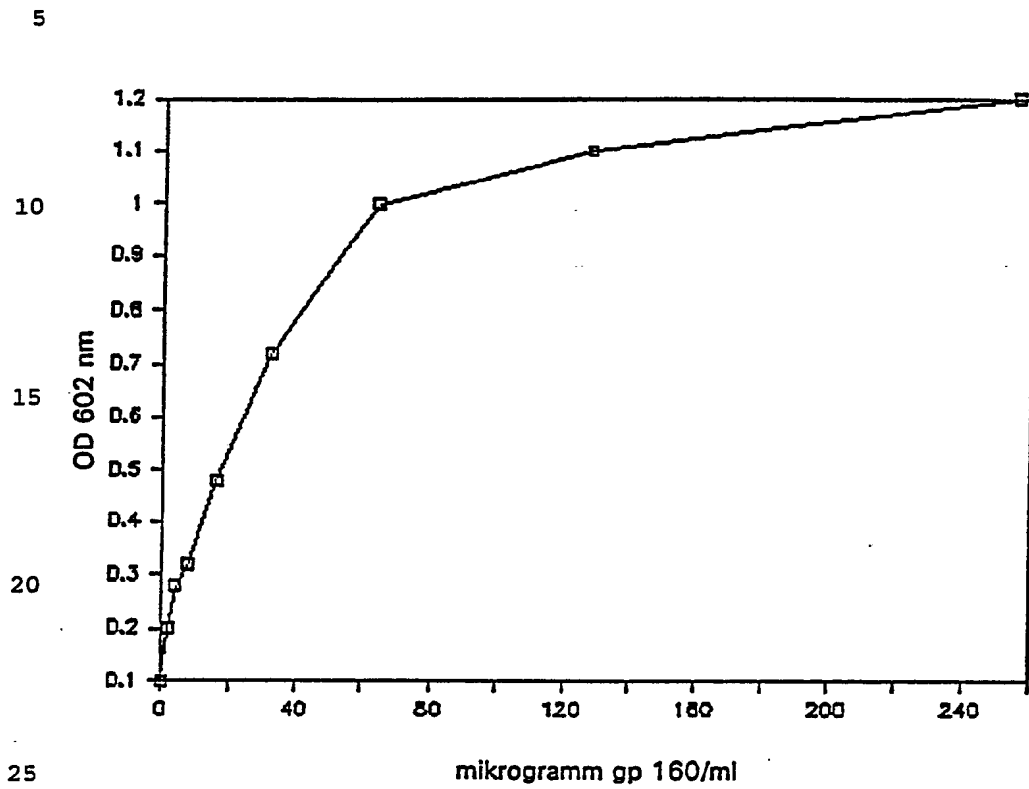
40

ERSATZBLATT

3 / 4

Direkter Nachweis von HiV-1 Antigen

Standardkurve

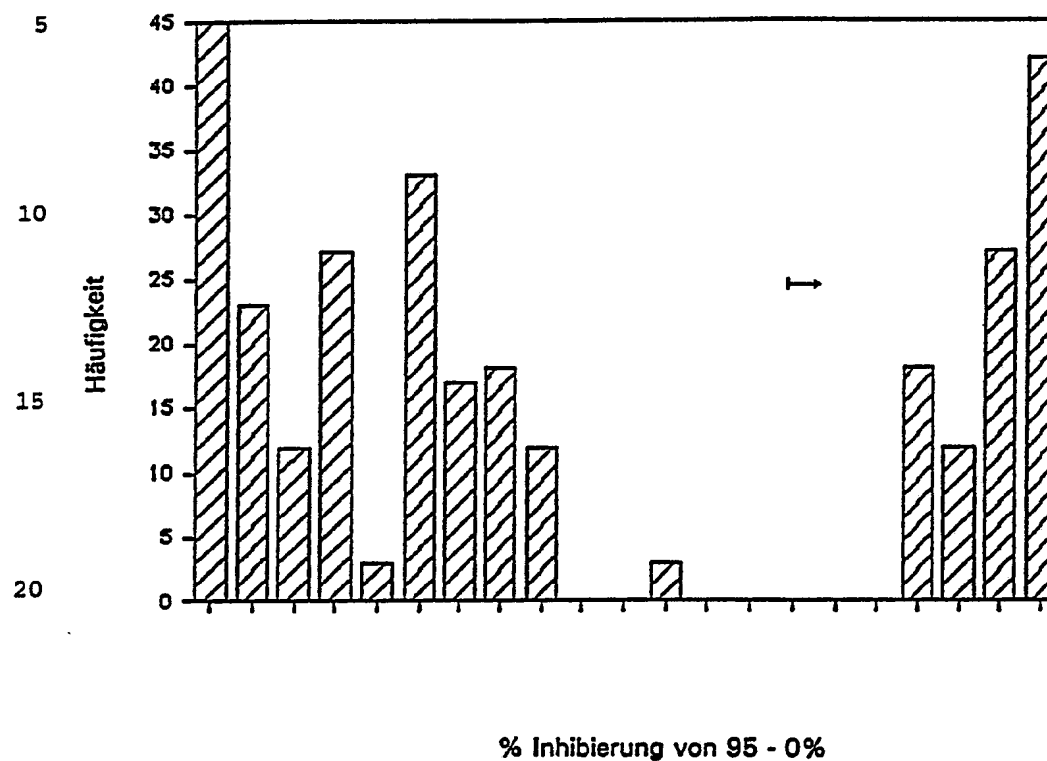


30 Abbildung 3: Standardkurve zum direkten Nachweis von HIV-1 Antigen
mittels ELISA

35

40

Kompetitiver ELISA mit APsc3D6 Protein



30 **Abbildung 4:** Inhibierung der Bindung von EcPhoA - sc3D6 Fusionsprotein an gp160 durch HIV-1 positive Sera

35

40

ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/AT 91/00067

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (If several classification symbols apply, indicate all) *		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl. ⁵ C12N 15/13 C07K 13/00 C12P 21/08 A61K 39/42 G01N 33/569		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
Int.Cl. ⁵	C07K C12N	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched *		
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT *		
Category *	Citation of Document, ¹¹ with Indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
Y	EP, A, 0314317 (GENENTECH) 3 May 1989 see page 3, lines 11-18; pages 4,5; claims	1-12
Y	WO, A, 89043 70 (CL-PHARMA AG) 18 May 1989 see the whole document	1-12
Y	Journal of Biochemical and Biophysical Methods, vol. 19, 1989, Elsevier Science Publishers B.V. A. Jungbauer et al.: "Pilot scale production of human monoclonal antibody against human immunodeficient virus HIV-1", pages 223-240, see the whole article (cited in the application)	1-12
Y	Nature, vol. 337, 9 February 1989, D.J. Capon et al. "Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy" pages 525-531, see the whole article	1-12
Y	Journal of Immunological Methods, vol. 106, 1988, Elsevier Science Publishers B.V., R. Grunow et al.: "The high efficiency, human B cell immortalizing heteromyeloma CB-F7", pages 257-265, see the abstract; pages 263, 264 (cited in the application)	1-12
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>* Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search	Date of Mailing of this International Search Report	
10 September 1991 (10.09.91)	25 October 1991 (25.10.91)	
International Searching Authority	Signature of Authorized Officer	
EUROPEAN PATENT OFFICE		

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		
Category *	Citation of Document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to Claim No
P,X	Nucleic Acids Research, vol. 18, No. 16, 1990, Oxford University Press, (Oxford, GB), M. Felgenhauer et al.: "Nucleotide sequences of the cDNAs encoding the V-regions of H- and L-chains of a human monoclonal antibody specific to HIV-1 - gp41", page 4927, see the whole article	1-7
P,X	FEMS Microbiology, vol. 64, September 1990, Elsevier Science Publishers B.V., C. Larcher et al.: "Characterization of monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 gp41 by HIV-1 polypeptides expressed in Escherichia coli" pages 103-110, see the whole article	1-12

**ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO.**

AT 9100067
SA 47835

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on 10/10/91
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

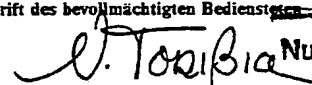
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP-A- 0314317	03-05-89	AU-A- 2557188	18-04-89
		EP-A- 0383799	29-08-90

WO-A- 8904370	18-05-89	EP-A- 0355140	28-02-90
		JP-T- 2502251	26-07-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/AT 91/00067

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.C1.5 A 61 K 39/42	C 12 N 15/13 G 01 N 33/569	C 07 K 13/00 C 12 P 21/08
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.C1.5	C 07 K C 12 N	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ^o	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
Y	EP,A,0314317 (GENENTECH) 3. Mai 1989, siehe Seite 3, Zeilen 11-18; Seiten 4,5; Ansprüche ---	1-12
Y	WO,A,8904370 (CL-PHARMA AG) 18. Mai 1989, siehe das ganze Dokument ---	1-12
Y	Journal of Biochemical and Biophysical Methods, Band 19, 1989, Elsevier Science Publishers B.V., A. Jungbauer et al.: "Pilot scale production of a human monoclonal antibody against human immunodeficiency virus HIV-1", Seiten 223-240, siehe den ganzen Artikel (in der Anmeldung erwähnt) --- -/-	1-12
<p>^o Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen ¹⁰ :</p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 48%;"> <p>^{"A"} Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>^{"E"} älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>^{"L"} Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>^{"O"} Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>^{"P"} Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> </div> <div style="width: 48%;"> <p>^{"T"} Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>^{"X"} Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>^{"Y"} Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>^{"&"} Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p> </div> </div>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
10-09-1991		25. 10. 91
Internationale Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten
EUROPAISCHES PATENTAMT		 Nurla TORIRIO

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)

Art °	Kenzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	Nature, Band 337, 9. Februar 1989, D.J. Capon et al.: "Designing CD4 immunoadhesins for AIDS therapy", Seiten 525-531, siehe den ganzen Artikel ---	1-12
Y	Journal of Immunological Methods, Band 106, 1988, Elsevier Science Publishers B.V., R. Grunow et al.: "The high efficiency, human B cell immortalizing heteromyeloma CB-F7", Seiten 257-265, siehe Zusammenfassung; Seiten 263,264 (in der Anmeldung erwähnt) ---	1-12
P,X	Nucleic Acids Research, Band 18, Nr. 16, 1990, Oxford University Press, (Oxford, GB), M. Felgenhauer et al.: "Nucleotide sequences of the cDNAs encoding the V-regions of H- and L-chains of a human monoclonal antibody specific to HIV-1 - gp41", Seite 4927, siehe den ganzen Artikel ---	1-7
P,X	FEMS Microbiology Immunology, Band 64, September 1990, Elsevier Science Publishers B.V., C. Larcher et al.: "Characterization of monoclonal antibodies to human immunodeficiency virus type 1 gp41 by HIV-1 polypeptides expressed in Escherichia coli", Seiten 103-110, siehe den ganzen Artikel -----	1-12

**ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.**

AT 9100067
SA 47835

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 10/10/91

Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP-A- 0314317	03-05-89	AU-A- 2557188	18-04-89
		EP-A- 0383799	29-08-90
-----	-----	-----	-----
WO-A- 8904370	18-05-89	EP-A- 0355140	28-02-90
		JP-T- 2502251	26-07-90
-----	-----	-----	-----

EPO FORM P0473

Für nähere Einzelheiten zu diesem Anhang : siehe Amtsblatt des Europäischen Patentamts, Nr.12/82